

XP-002115743

1/1 - (C) WPI / DERWENT
AN - 96-006908 01!
AP - JP940104991 940421
PR - JP940104991 940421
TI - Prodn. of immunoglobulin and immunoglobulin monomer antibody against its antigen - by adding ethylene di:amine tetra-acetic acid to whey
IW - PRODUCE IMMUNOGLOBULIN IMMUNOGLOBULIN MONOMER ANTIBODY ANTIGEN ADD ETHYLENE DI AMINE TETRA ACETIC ACID WHEY
PA - (KYOD) KYODO NYUGYO KK
PN - JP7285885 A 951031 DW9601 A61K39/395 003pp
ORD - 1995-10-31
IC - A61K39/395 ; B01D61/14 ; C07K16/06
FS - CPI
DC - B04 J01
AB - J07285885 Prodn. immunoglobulin (I) comprises adding ethylene diamine tetraacetic acid in 0.5-10 mM concn. or glycine in 50-500 mM concn. to whey (II) prepd. by casein pptn. at isoelectric point (pH=4.5-4.6) or by treatment with enzyme such as rennin, adding aq. sodium citrate soln. to the whey to adjust pH=6.0-6.5, allowing to contact with cation-exchange resin and obtaining immunoglobulin by treatment with ultrafiltration module of separation limit 50,000-100,000 dalton.
- Also claimed are: production of immunoglobulin monomer (III) by allowing the immunoglobulin fraction obtd. by treatment of the whey (II) with ultrafiltration module of sepn. limit 100,000 dalton to contact with cation-exchange resin to remove immunoglobulin polymer; and production of immunoglobulin monomer (III) by allowing the immunoglobulin (I) to contact cation-exchange resin to remove immune globulin polymer.
- USE - (I), including (III), is useful in food industry.
- ADVANTAGE - The process can produce (I) and (III) from whey in lower cost and in purer and more stable state than conventional methods.
- In an example, (1) Foremilk of 0-3 days after birth of bovine 3-weeks sensitized with human IgE was collected, treated with cream separator to remove fat and oil giving skim milk, to which was added equal volume of

or 100 mM glycine used in (2) and the resultant leaving liquor was allowed to contact with 'DEAE-Cellulofine' (RTM) to collect non-adsorbed fraction followed by lyophilization. (4) IgG monomer prepared in (2) was allowed to contact with 'DEAE-Cellulofine' (RTM) as the manner mentioned in (3) to remove IgG polymer followed by lyophilization. Yield (%), purity (%) and potency (X 1,000/mg solid, X 100,000 protein) of the products given in processes (2), (3) and (4) were as: (2) 84.3, 90.2, 3.1 and 3.2; (3) 67.6, 88.5, 2.9 and 3.1; and 80.1, 93.3, 3.2 and 3.3. (Dwg. 0/0)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-285885

(43) 公開日 平成7年(1995)10月31日

(51) Int.Cl. [°]	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	X			
B 0 1 D 61/14	5 0 0	9153-4D		
C 0 7 K 16/06		8318-4H		

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平6-104991

(22) 出願日 平成6年(1994)4月21日

(71) 出願人 000162412

協同乳業株式会社

東京都中央区日本橋小網町17番2号

(72) 発明者 大石 一二三

東京都練馬区関町東1-27-6-303

(72) 発明者 広中 貴宏

東京都青梅市新町96-303

(72) 発明者 桐原 修

東京都立川市柴崎町4-11-6-101

(72) 発明者 野々村 一彦

埼玉県狭山市入間川1545-27

(74) 代理人 弁理士 石山 博 (外1名)

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリンの製造法

(57) 【要約】

【目的】 免疫グロブリン及びこれによつて得られた免疫グロブリン(抗原)による免疫グロブリン単量体の製造法に関する。

【構成】 カゼインの等電点(pH4.5-4.6)沈殿又はレンニン等の酵素処理で得た乳清に、エチレンジアミン四酢酸の濃度0.5-10mM、又はグリシンの濃度が50-500mMになるように加え、クエン酸ナトリウム溶液で乳清のpHを6.0-6.5に調整し、これに陽イオン交換樹脂を接触させ、50,000又は100,000ダルトンの分離限界を有する限外濾過モジュールを用いて、目的とする免疫グロブリンを得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カゼインの等電点(pH4.5-4.6)沈殿又はレンニン等の酵素処理で得た乳清に、エチレンジアミン四酢酸の濃度0.5-10mM、又はグリシンの濃度が50-500mMになるように加え、クエン酸ナトリウム溶液で乳清のpHを6.0-6.5に調整し、これに陽イオン交換樹脂を接触させ、50,000又は100,000ダルトンの分離限界を有する限外濾過モジュールを用いて、目的とする免疫グロブリンを得ることを特徴とする免疫グロブリンの製造法。

【請求項2】 請求項1で得た乳清を100,000ダルトンの分離限界を有する限外濾過モジュールで得た免疫グロブリン画分に陽イオン交換樹脂を接触させ、免疫グロブリンの重合体を除去することを特徴とする免疫グロブリン単量体の製造法。

【請求項3】 請求項1で得た免疫グロブリンと、陽イオン交換樹脂とを接触させ、免疫グロブリン重合体を除去することを特徴とする免疫グロブリン単量体の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は免疫グロブリン及びこれによって得られた免疫グロブリンによる免疫グロブリン単量体の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】ウシ初乳には1ml当たりIgG 64.9、IgD 2.2、IgA 3.5、IgM 8.7mgの免疫グロブリン(Ig)が含まれており(Butler, J.E., ed. Butler, J.E., "The Ruminant Immune System", pp3-55, Plenum Press, New York, 1981)、このIgを分取し、積極的に用いようとの試みが多方面で検討されている。

【0003】Igの中でもメインターゲットにされているのは、最も量の多いIgG画分であり、これの一般的な調製法は、塩析、ゲル濾過、イオン交換法等の組み合わせであり、特異性が要求される場合にはプロテインAをリガンドにしたアフィニティークロマトグラフィーを用いている。特殊な抗原に対する抗体を得、研究又は医薬品とするのであれば、これらの調製法によるコストの上昇を吸収し得るが、食品又はそれに類する物に用いるのであれば、それら調製法による製品のコストは非現実的である。

【0004】したがって、既述の調製法以外にもFeCl₃ (Kuwata, T. et. al., Elimination of β -lactoglobulin from whey to stimulate human milk protein. j. Food Sci., 50, 605-609, 1985)、NaCl (Mailliart, P. et. al., J. Food Sci., 53(3), 743, 1988)、限外濾過(桐原 修、ウシ免疫グロブリンの分離と利用、酪農科学、食品の研究、39、A-301-A-305、1990)等による調製法も報告されている。

【0005】これらの各方法は非常に簡便であり、製造コストを低く抑えられる利点を有するものの、特異性に

欠け、特に限外濾過(UF)法以外の方法は抗体価の著しい低下を来す。またUF法は基本的に分子量差による分画であり有効な方法であるが、牛乳ホエーには β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、ウシ血清アルブミン等に代表されるように種々の物質と結合しやすいタンパク質が存在する。

【0006】とくに既述タンパク質は脂質類と非常に結合しやすく、また β -ラクトグロブリンはホエー中に存在するラクトフェリンとも強く結合する(Ena, J.M. et. al., Isolation of human lactoferrin by affinity chromatography using insolubilized bovine β -lactoglobulin. J. Chromato., 525, 442-446, 1990)ことから、ホエー中でのこれらのタンパク質の見かけ上の分子量は非常に大きく、UF処理による分画の障害となつている。

【0007】したがって、UF法によりIgを製造した場合、その純度は70-80%程度(南 善行らの「牛乳中の免疫グロブリンの濃縮方法」(特開昭60-75433号公報)、ノベルトコーテラの「乳および/または初乳免疫グロブリン溶液の製造方法」(特開昭61-68429号公報)であり、種々の夾雑物を含み純度的に満足できるものではなかつた。また従来の方法ではIgGが重合体として存在している場合が多く、その力価を安定にすることは殆んど不可能に近い状態でもあつた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】この発明は従来の技術における種々の障害及び問題点を改善しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】ここにおいてこの発明は、カゼインの等電点(pH4.5-4.6)沈殿又はレンニン等の酵素処理で得た乳清に、エチレンジアミン四酢酸の濃度0.5-10mM、又はグリシンの濃度が50-500mMになるように加え、クエン酸ナトリウム溶液で乳清のpHを6.0-6.5に調整し、これに陽イオン交換樹脂を接触させ、50,000又は100,000ダルトンの分離限界を有する限外濾過モジュールを用いて、目的とする免疫グロブリンを得ることを特徴とする免疫グロブリンの製造法を提案し、更にこれにもとづいて、上記方法で得た乳清を100,000ダルトンの分離限界を有する限外濾過モジュールで得た免疫グロブリン画分に陽イオン交換樹脂を接触させ、免疫グロブリンの重合体を除去することを特徴とする免疫グロブリン単量体の製造法並びに上記方法で得た免疫グロブリンと、陽イオン交換樹脂とを接触させ、免疫グロブリン重合体を除去することを特徴とする免疫グロブリン単量体の製造法を提案するものである。

【0010】

【作用】上記方法によつて免疫グロブリンを得、これにもとづいて免疫グロブリン単量体を製造する。

【0011】

【実施例】

(1)ウシ初乳乳清の調製:分娩3週間前からヒトIgEを常法で感作したウシから、分娩後0-3日目までの初乳を採取した。クリームセパレータで脂肪を除去し、脱脂乳を得た。これに等量の脱イオン水を加え、EDTAを0.5-10mM(好ましくは1mM)又はグリシン濃度が50-500mM(好ましくは100mM)になるように加えた後、クエン酸でpHは4.5-4.6に調整した。生じた沈殿物を遠心分離で除去し、乳清を得た。この乳清のpHを水酸化ナトリウムで6.0-6.5に調整し、実験に用いた。この時、感作する抗原(ヒトIgE)はこの発明を説明するためだけのものである。

【0012】(2)IgG単量体の調製:上記(1)で得た乳清300mlに、DEAE-セルロフアイン(生化学工業社製)20gを加え、穏やかに攪拌した後、ブフナー漏斗で濾過し、非吸着画分を集め、50K又は100Kダルトンの分離限界を有する限外濾過モジュール(旭化成社製)を用いて限外濾過を行なった。濃縮されたリテンテイトを1mMEDTA又は100mMグリシンを含む10mMクエン酸緩衝液(pH6.0-6.5)で希釈し、限外濾過を繰り返した。この操作により低分子物*

*質を除去した後、リテンテイトを凍結乾燥した。

【0013】(3)上記(1)で得た乳清を(2)で用いた限外濾過モジュール及び1mMEDTA又は100mMグリシンを含む緩衝液存在下で濾過し、得られたリテンテイトとDEAE-セルロフアインを接触させ、非吸着画分を集め、これを凍結乾燥した。

【0014】(4)上記(2)に記載の手法でIgG単量体を製造する場合、限外濾過中のポンプに起因する加圧や剪断力等の物理的力により、IgGが重合体を形成するのが散見される。このIgG重合体を(3)に記載の手法のように、DEAE-セルロフアインを接触させることにより除去し、凍結乾燥した。

【0015】次に(2)、(3)及び(4)に記載の方法により得たIgG調整物の収率、純度及び力価をまとめて表1に示す。

【0016】

【表1】

手法	収量(%) ^{1*}	純度(%) ^{2*}	力価($\times 10^3$ /mg・固形物)	力価($\times 10^3$ mg・タンパク質)
(2)	84.3	90.2	3.1	3.2
(3)	67.6	88.5	2.8	3.1
(4)	80.1	93.3	3.2	3.3

1*:収量は手法(1)に記載の方法で得た乳清のIgG含量を100%として算出した。

2*:純度はゲル濾過法又はELISA法によりIgG単量体量得、算出した。

【0017】

【発明の効果】上記方法によれば、乳清にエチレンジアミン四酢酸及びグリシンを加え、pH6.0-6.5において、※

※陽イオン交換樹脂及び限外濾過モジュールを用いて免疫グロブリンを得ることができるものである。